

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/09613 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
G01N 33/68, C12Q  
1/68, C07K 16/18, A61K 48/00, 39/395

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): FONDA-  
TION JEAN DAUSSET-CEPH [FR/FR]; 27, rue Juliette  
Dodu, F-75010 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02036

(72) Inventeur; et  
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): NERI, Chris-  
tian [FR/FR]; 5, rue Reculettes, F-75013 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 13 juillet 2000 (13.07.2000)

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(81) États désignés (national): CA, JP, US.

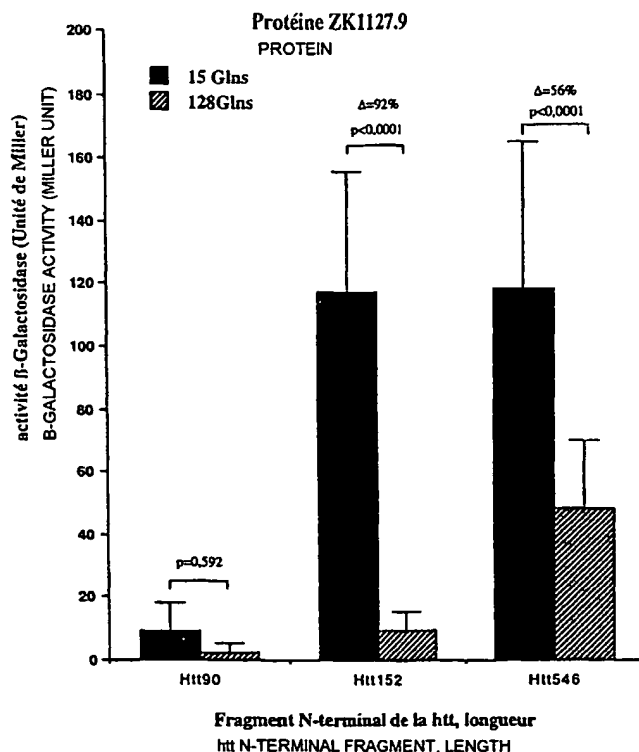
(30) Données relatives à la priorité:  
99/09855 29 juillet 1999 (29.07.1999) FR

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING MOLECULES FOR THE TREATMENT OF HUNTINGTON DISEASE

(54) Titre: PROCEDE DE CRIBLAGE DE MOLECULES DESTINEES AU TRAITEMENT DE LA MALADIE DE HUNTING-  
TON



(57) Abstract: The invention concerns a method for screening molecules for the treatment of Huntington disease and a method for identifying therapeutic targets for said disease. The methods are based on the identification of molecules which are capable of modifying the interaction normal htt/ CA 150.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet un procédé de criblage de molécules destiné au traitement de la maladie de Huntington ainsi qu'un procédé d'identification de cibles thérapeutiques pour cette maladie. Les procédés se basent sur l'identification de molécules capables de modifier l'interaction htt normale / CA150.

WO 01/09613 A1



**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

## PROCEDE DE CRIBLAGE DE MOLECULES DESTINEES AU TRAITEMENT DE LA MALADIE DE HUNTINGTON

La présente invention a pour objet un procédé de criblage de  
5 molécules destiné au traitement de la maladie de Huntington ainsi que  
l'utilisation de molécules ainsi mises en évidence pour la préparation d'un  
médicament destiné au traitement curatif ou préventif de cette maladie. Elle  
concerne également un procédé d'identification de cibles thérapeutiques  
pour la maladie de Huntington et l'utilisation de séquences nucléotidiques  
10 correspondant à des gènes impliqués dans le développement de cette  
maladie afin de la traiter.

La maladie de Huntington (Huntington Disease ou HD) est une  
maladie neurodégénérative dominante autosomale à expansion de  
polyglutamines (polyQ) dont le gène code pour la huntingtine (htt), une  
15 protéine de fonction inconnue exprimée dans le cerveau et plusieurs autres  
tissus. L'expansion de polyQ (suite à une mutation dynamique-ou  
expansion-CAG dans le gène de la htt) se situe dans la partie N-terminale de  
la htt, une région conservée et fonctionnellement importante pour  
l'apparition de HD. La htt normale contient un nombre normal de  
20 répétitions glutamines (Glns) (typiquement : 15 à 20 Glns, principalement :  
moins de 39 Glns). La htt mutée contient un nombre anormalement élevé de  
répétitions glutamines (typiquement le seuil pathologique est d'environ 39  
Glns, l'expansion de polyGlns pouvant par exemple atteindre jusqu'à 180  
Glns dans certains cas) qui est associé à l'apparition de la maladie (Koshy et  
25 Zoghbi, 1997). La htt serait une protéine importante pour la genèse et la  
survie du neurone (Zeitlin et al., 1995 ; White et al., 1997). A l'état normal,  
cette protéine est localisée essentiellement dans le cytoplasme des neurones  
où elle est par exemple associée aux microtubules (DiFiglia et al., 1997). La  
htt normale a aussi été détectée dans le noyau, dans des cellules de  
30 neuroblastome de souris (de Rooij, 1996), et dans le cerveau humain post-  
mortem (Hoogeveen et al., 1993).

Sur le plan tissulaire, HD se caractérise en premier lieu par une  
apoptose progressive et sélective des neurones striataux ; à des stades plus  
avancées, HD affecte d'autres régions du cerveau comme le cortex (Koshy

et Zoghbi, 1997). Les bases moléculaires de cette sélectivité ne sont pas connues.

Les formes normales et mutées de la htt étant exprimées à des niveaux similaires, la cause de HD est à rechercher dans des perturbations biochimiques des voies de signalisation impliquées dans la genèse, le  
5 fonctionnement, et la survie des neurones atteints dans HD.

Par ailleurs, il existe une corrélation inverse entre l'âge d'apparition et la sévérité de HD et/ou le nombre de répétitions glutamines dans la htt (Koshy et Zoghbi, 1997), ce qui indique que la gravité de la perturbation de  
10 ces fonctions biochimiques est modulée par la longueur du domaine polyglus.

Il n'existe pas de traitement pour cette maladie gravement invalidante (6000 personnes en France, prévalence apparente voisine de 1/10.000). L'identification des facteurs biochimiques impliqués dans HD  
15 est nécessaire afin d'identifier des cibles thérapeutiques pour cette maladie, et de procéder à la recherche de méthodes thérapeutiques et de composés actifs permettant de restaurer un fonctionnement normal des voies de signalisation intracellulaires importantes pour la survie et le bon fonctionnement des neurones atteints dans HD.

20 Chez les malades, des agrégats nucléaires (parfois périnucléaires) composés de fragments N-terminaux de la htt et d'ubiquitine ont été mis en évidence (DiFiglia et al., 1997). Le fait que les agrégats soient détectés avant l'apparition de l'apoptose dans des modèles cellulaires in vitro et dans des modèles de souris transgéniques a initialement conduit à l'hypothèse  
25 que les agrégats nucléaires pouvaient être à l'origine de la maladie (Mangiarini et al., 1996 ; Davies et al., 1997 ; Ross, 1997). Cependant, les résultats les plus récents favorisent fortement l'hypothèse d'un effet des formes libres de la htt mutée comme mécanisme physiopathologique fondamental de HD (Sisodia, 1998). Plusieurs études (sur cerveaux post-  
30 mortem, cultures primaires de neurones striataux de rat, d'autres modèles cellulaires in vitro, et de modèles chez la souris) indiquent en effet qu'il n'existe pas une bonne corrélation entre la formation d'agrégats et l'apoptose des neurones cibles (Bates et al., 1998 ; Lunkes et Mandel, 1998 ; Saudou et al., 1998 ; Sisodia, 1998 ; Hackam et al., 1999 ; Schilling et al.,

1999). Ces agrégats sont de plus susceptibles de protéger fortuitement le neurone contre un excès d'apoptose provoqué par la htt mutée non-agrégée (Saudou et al., 1998). Par contre, la localisation nucléaire de fragments N-terminaux « libres » de la htt mutée est nécessaire à l'induction de  
5 l'apoptose neuronale (Saudou et al., 1998).

Le noyau pourrait donc être le lieu privilégié des mécanismes physiopathologiques de HD, notamment en terme de dysrégulation de la transcription et d'expression inadéquate de certains gènes et protéines.

Un autre aspect important de la physiopathologie de HD réside dans  
10 le fait que le dysfonctionnement neuronal avant apoptose est fortement susceptible d'être à l'origine, en tout ou en partie, de cette maladie. Dans les modèles transgéniques de HD chez la souris, il a en effet été observé que les symptômes comportementaux chez les souris transgéniques (expression d'un fragment N-terminal de la htt mutée correspondant à l'exon 1 du gène  
15 de cette protéine) apparaissent avant la détection d'une apoptose des neurones (Bates et al., 1998).

Par ailleurs, l'expansion de polyglus induit probablement un changement de conformation des fragments N-terminaux de la htt, dont les conséquences pathologiques iraient de pair avec la dégradation  
20 protéolytique progressive de la htt (initialement par les caspases comme la caspase-3, puis par d'autres protéases non identifiées) et la genèse de fragments N-terminaux de plus en plus courts et comprenant par exemple les aminoacides 1-500, 1-300, puis 1-150, et 1-100 (Goldberg et al., 1996 ; Lunkes et Mandel, 1998 ; Martindale et al., 1998 ; Sharp et al., 1998 ;  
25 Schilling et al., 1999), et leur diffusion passive dans le noyau au travers des pores nucléaires (Hackam et al., 1999). En effet, les 50 à 200 premiers aminoacides suffisent à induire des phénotypes cellulaires voire comportementaux similaires à ceux observés dans HD dans des modèles transgéniques de souris (Mangianiri et al., 1996 ; Bates et al., 1998), de  
30 drosophile (Jackson et al., 1998), et de nématode *C. elegans* (Faber et al., 1999 ; Néri et al., 1998).

L'expansion de polyQ (au travers du changement de conformation mentionné ci-dessus) modifierait aussi l'accessibilité des protéines partenaires de la huntingtine (PPH) à leurs sites de liaison dans la htt (hors

du domaine polyQ), avec pour conséquence une diminution ou une augmentation de la liaison de la htt mutée avec les PPH appartenant à des voies de signalisation intracellulaires essentielles pour le fonctionnement et la survie du neurone. Le rôle potentiel d'interactions protéine-protéine anormales dans HD a été illustré par l'identification en criblage double-hybride (Fields et Song, 1989) de plusieurs PPH qui se lient à la région N-terminale de la htt (amino-acides 1 à 500). La majorité de ces PPH semblent se lier à la htt en dehors du domaine polyglus. Dans le cas où ces PPH ont été identifiées par criblage de banques d'ADNc non humains (par exemple, ADNc de rat ou de souris), il a été montré que les homologues humains de ces PPH se lient effectivement à la htt in vitro, et qu'ils co-localisent avec la htt dans des extraits de cerveau humain. D'une façon générale, il n'existe pas de corrélation systématique entre le profil d'expression des PPH identifiées à ce jour et les sites de perte neuronale observés dans HD. Il s'agit essentiellement des PPH suivantes :

- GAPDH (Burke et al., 1996 ; *liaison invariante* accrue avec la htt mutée) : enzyme impliquée dans la glycolyse et le métabolisme énergétique.
- HIP2 (Kalchman et al., 1996 ; *liaison invariante* avec la htt mutée) : Enzyme de conjugaison à l'ubiquitine.
- Cystathionine  $\beta$ -synthase ou CBS (Boutell et al., 1998 ; *liaison invariante* avec la htt mutée) : enzyme-clé de la synthèse de cystéine à partir de la méthionine. L'absence de CBS est associée à l'accumulation du substrat de la CBS qui est excitotoxique (l'homocystéine), et à une maladie métabolique humaine rare (homocystinurie). Le rôle d'un mécanisme similaire dans HD n'est pas établi.
- HAP1 (Li et al., 1995 et WO 97/17443 ; *liaison accrue* avec la htt mutée) et HIP1 (Kalchman et al., 1997; Wanker et al. 1997 ; *diminution de liaison* avec la htt mutée) : protéines de fonction inconnue associées au cytosquelette dont les sites de liaison semblent compris entre les amino-acides 171 et 500. HAP1 interagit avec plusieurs protéines, notamment la sous-unité p150<sup>Glued</sup> de la dynactine (Engelender et al., 1997), ce qui confirme le rôle de HAP1 dans la formation et l'activité du cytosquelette et le trafic des vésicules intracellulaires.

- HYPA et HYPB (Faber et al., 1998 ; *augmentation de liaison* avec la htt mutée) : protéines à domaine WW de fonction inconnue, liaison au niveau des deux polyprolines immédiatement en C-terminal du domaine polyQ.
- SH3GL3 (Sittler et al., 1998 : *liaison accrue* avec la htt mutée) : protéine  
5 de fonction inconnue à domaine SH3 appartenant à la famille Grb2, les membres de cette famille étant associés aux synaptosomes, liaison au niveau des deux polyprolines immédiatement C-terminale à la polyglns. Rôle promoteur de SH3GL3 dans la formation d'agrégats.

10 Il est important de noter trois points :

- 1) Plusieurs PPH qui présentent un accroissement de liaison envers la htt mutée (HAP1, SH3GL3, série HYP) sont associées à la formation des agrégats nucléaires comme SH3GL3 qui présente un rôle promoteur sur leur formation (Sittler et al., 1998), ou HIP2 qui est directement associée  
15 à la cinétique de dégradation ou d'accumulation des protéines intracellulaires. Les agrégats n'étant pas une cause *sine qua non* de l'apoptose (Saudou et al., 1998 ; Sisodia, 1998), la recherche d'un blocage d'une liaison anormalement accrue et « neurotoxique » entre la htt mutée et une PPH par un composé actif (tel que décrit par C.A Ross et al., 'Huntingtin-associated protein', WO97/17443) est en fait susceptible  
20 de ne pas constituer une bonne option thérapeutique. De plus, ces PPH présentent *a priori* des variations modérées d'interaction (en général d'un facteur 2 à 5) pour la htt mutée (40-60 Glus) en comparaison de la htt normale (20 Glus). En vertu de l'état de l'art dans le domaine des petites  
25 molécules, il est difficile d'envisager le blocage spécifique « bénéfique » d'une liaison modérément accrue entre la htt mutée et une PPH, en absence d'un effet secondaire « inapproprié » de blocage de la liaison entre la htt normale et cette même PPH.
- 2) HIP1 est la seule PPH qui montrait à ce jour une perte de liaison avec la  
30 htt mutée. HIP1 interagit environ 10 fois moins bien avec la htt mutée comprenant 125 Glus qu'avec la htt normale comprenant 25 Glus (Kalchman et al., 1997 et WO 97/18825). Cette protéine est spécifiquement exprimée dans le cerveau, plus particulièrement dans le cortex. Sa fonction est inconnue : l'homologie de 20-40% avec Sla2p



suggère un rôle dans la formation du cytosquelette, et la présence d'un motif de type « Leucine zipper » suggère une implication dans plusieurs interactions protéine-protéine. Le rôle de HIP1 dans la formation du cytosquelette est appuyé par le fait que cette protéine est associée aux membranes cellulaires (débris cellulaires, noyau, synaptosomes, mitochondries, microsomes et membranes plasmiques), une caractéristique commune de toutes les protéines du cytosquelette comme l'actine. HIP1 n'étant pas lié à la formation des agrégats, il s'agit d'une cible thérapeutique intéressante. Cependant, le fait qu'il s'agisse d'une protéine du cytosquelette ne rentre pas dans le cadre des dernières données de la littérature scientifique qui indiquent que la localisation nucléaire de la htt mutée est nécessaire pour la mise en place des mécanismes physiopathologiques de HD (Saudou et al. 1998 ; Sisodia, 1998).

- 3) L'influence de la longueur du fragments N-terminal (notamment ceux susceptibles de passer dans le noyau) sur la liaison de la htt aux PPH n'a pas été décrite auparavant.

Dans ce cadre, les inventeurs apportent les nouveaux éléments suivants : identification d'une nouvelle PPH à domaine WW dont l'homologue humain est un facteur de transcription nucléaire contenant un domaine polymorphique (répétition de dipeptides QA ou Glu-Ala), et identification des conditions biochimiques (taille des fragments de la htt) qui vont de pair avec des différences notables de liaison de cette PPH avec la htt mutée et la htt normale dans le noyau. Les cibles thérapeutiques et les fortes différences identifiées par les inventeurs sont compatibles avec la notion d'interventions thérapeutiques qui visent à agir sur les effets pathologiques de certaines formes de la htt mutée, sans effets secondaires sur les fonctions physiologiques normales de certaines formes de la htt normale.

Le criblage en double-hybride pour des partenaires de la htt constitue un point d'entrée particulièrement intéressant vers la biologie des neurones affectés dans HD. La preuve ultime qu'une PPH est effectivement impliquée dans des déficiences neuronales provient d'expériences supplémentaires *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, il est possible de prouver *in vivo* dans un

organisme entier 1) que la cible candidate est effectivement impliquée dans le phénotype de maladie (perte de fonction ou apoptose) reproduit dans l'organisme modèle utilisé, 2) qu'il est possible de moduler son activité biologique, et 3) que cette modulation peut permettre de restaurer un fonctionnement normal des neurones rendus déficients par la htt mutée. Cette validation dite « cellulaire » (établissement d'un lien direct entre un phénotype biochimique et un phénotype cellulaire) peut s'effectuer dans un organisme entier et dans un temps relativement court grâce à l'utilisation du nématode *Caenorhabditis elegans*. Ainsi, il est possible d'identifier les « voies génétiques » impliquées dans un phénotype de déficience neuronale grâce à la recherche de mutants suppresseurs. *C. elegans* permet aussi d'étudier les PPH ou les « voies physiques » (interactions protéine-protéine) d'intérêt et de fonction inconnue qui ont été initialement identifiées par criblage double-hybride dans la levure, en permettant d'étudier les profils d'expression et les phénotypes mutants pour les homologues de ces PPH dans *C. elegans*.

Sur un plan de thérapeutique prospective en neurobiologie, *C. elegans* présente en effet les avantages suivants : système nerveux bien caractérisé, bonne homologie fonctionnelle avec l'humain en terme de physiologie neuronale, nombreux phénotypes neurologiques normaux et mutants disponibles à l'analyse. Par rapport à d'autres organismes modèles simples comme la drosophile (Jackson et al., 1998), *C. elegans* a de plus les avantages suivants : génome complètement séquencé, mutagenèse plus rapide, organisme transparent permettant une visualisation de tous les neurones et une analyse de l'expression des protéines chez l'animal vivant, court cycle de reproduction (quelques jours), connaissance de la phylogénie cellulaire complète, facilité d'utilisation (culture sur agar solide ou liquide, résistance des larves à la congélation, et possibilité de criblage à haut débit, par exemple en microplaques à 96 puits).

Du fait de la forte conservation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires entre le nématode et d'autres espèces incluant l'humain, notamment en terme de physiologie neuronale (Bargman, 1998 ; Ruvkun et Hobert, 1998 ; The *C. elegans* Sequencing consortium, 1998), l'étude des mécanismes de maladies humaines dans *C. elegans* est reconnue comme un

56%. Le phénomène de perte d'interaction entre ZK1127.9\_187-758 et htt est d'autant plus marqué que la taille des fragments N-terminaux de la htt mutée est réduite. Cette perte d'interaction est susceptible d'être complète pour tout fragment de la htt contenant moins de 546 amino-acides et plus de 90 aminoacides. En effet, ZK1127.9\_187-758 n'est pas capable d'interagir avec htt90Q15, ce qui indique la région 90-546 de la htt contient les sites de liaison pour ZK1127.9. La perte d'interaction entre ZK1127.9\_187-758 et htt est pratiquement complète pour htt152Q128. La mise en évidence d'une perte d'interaction entre htt mutée et protéines à domaine WW, et le fait que cette perte soit dépendante de la longueur du fragment N-terminal de la htt sont des faits nouveaux, qui signalent un nouveau mécanisme potentiellement important de l'apoptose neuronale ou du dysfonctionnement neuronal dans HD, et soulignent la grande valeur potentielle du couple htt-CA150 comme cible thérapeutique.

Par ailleurs, ZK1127.9 présente une homologie significative de séquence avec le facteur de transcription nucléaire humain CA150, facteur dont le gène s'avère être exprimé dans le cerveau humain. Ceci suggère fortement que certaines formes de la htt mutée sont incapables de se lier correctement à CA150 dans le cerveau des malades. Ceci suggère aussi que plusieurs gènes humains ne sont pas correctement exprimés dans HD du fait d'un déficit dans les mécanismes de régulation de la transcription sous contrôle du couple htt-CA150.

Les profils d'expression des EST humains correspondant à la htt et à CA150 indiquent que ces deux protéines sont exprimées dans le cerveau. Par ailleurs, le fait que CA150 soit une protéine nucléaire, que la taille des fragments de la htt testés par les inventeurs soit compatible avec un passage dans le noyau, et que la htt soit par ailleurs détectée dans le noyau des cellules neuronales, indiquent que CA150 et la htt co-localisent très probablement dans le noyau des neurones du cerveau.

En ce qui concerne les interactions 'htt- ZK1127.9' *in vitro* : Après expression et purification de protéines de fusion GST::htt et de ZK1127.9::épitopeHA dans *E. Coli* (vecteur pGEX, et vecteur pGEX-épitopeHA tel que modifié par les inventeurs), fixation de la htt sur billes sepharose (GST affinity resin, Stratagène), et incubation avec

ZK1127.9::HA, la rétention de ZK1127.9::HA par la htt normale et mutée a été testée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-HA.

En ce qui concerne les interactions htt-CA150 *in vitro* : après expression et purification de protéines de fusion GST : htt et de CA150 (fragment ou protéine entière) dans *E. coli* (vecteur pGEX et vecteur pGEX-épitope HA tel que modifié par les Inventeurs), fixation de la htt sur billes sepharose (GST affinity resin, Stratagène), et incubation avec CA150 : HA, la rétention de CA150 par la htt normale a été testée par western blot à l'aide d'anticorps anti-HA ou d'anticorps anti-CA150.

Mais également, après expression et purification de CA150 (source de l'ADNc complet: réseau IMAGE) dans *E. Coli*, couplage de CA150 sur billes sepharose et incubation avec des extraits protéiques de lignées lymphoblastoïdes normales ou de patients atteints de HD, et de cerveaux post-mortem (individus sains ou malades), la rétention de la htt par CA150 pourra être testée par western blot à l'aide d'anticorps anti-htt dont les épitopes sont localisés au niveau des 600 premiers amino-acides de la htt. La co-localisation de CA150 avec la htt dans ces tissus humains pourra être vérifiée par les techniques classiques de fractionnement subcellulaire et de western blot tel que précédemment décrit (Sittler et al., 1998). En complément, les interactions htt d'origine humaine-CA150 peuvent être testées directement en double-hybride dans la levure.

En ce qui concerne les propriétés biochimiques de CA150, lors des expériences de production de CA150 : HA dans *E. coli* et du contrôle de production par western blot à l'aide d'un anticorps anti-HA ou d'un anticorps antiCA150, les Inventeurs ont mis en évidence une forme non agrégée de CA150 migrant sur gel sensiblement à la taille attendue (environ 92 kDA), et des formes agrégées de CA150 migrant largement au-dessus de la taille attendue. Les propriétés d'agrégation de CA150 sont très certainement à attribuer à la région répétée (QA)<sub>38</sub> coté N-terminal, qui comme dans le cas des polyglutamines ou des polyalanines dans d'autres protéines humaines, s'avèrent capables de favoriser l'agrégation de la protéine porteuse avec elle-même, voire avec d'autres protéines. Les propriétés d'agrégation de CA150 mises en évidence par les Inventeurs sont susceptibles de participer aux mécanismes de la maladie de Huntington.

En ce qui concerne la fonction de ZK1127.9 dans *C. elegans* : les données décrites permettent d'étudier le rôle de ZK1127.9 dans *C. elegans* à l'aide des techniques classiques de transgénèse et de mutagenèse dans *C. elegans* : profil d'expression de ZK1127.9 dans *C. elegans* après expression en transgénèse de protéines de fusion ZK1127.9::GFP (typiquement 1-2 kb de séquence en amont de l'exon 1 plus le premier intron suffisent à l'expression d'une protéine chez *C. elegans*), et analyse du phénotype de mutants non-léthaux pour le gène de ZK1127.9 (sélection des mutants par criblage PCR de pools d'ADN correspondants à une banque de mutants induits par exposition au TMP et aux UV ; la mutagenèse TMP/UV générant une majorité de délétions de petite taille, elle est particulièrement adaptée au criblage PCR).

En ce qui concerne la validation cellulaire de cibles thérapeutiques dans un animal vivant : avec la confirmation de perte d'interaction entre htt mutée et CA150 et sur la base des informations recueillies sur la fonction de ZK1127.9, les sites de liaison entre CA150 et la htt normale peuvent être identifiés (par exemple par cartographie de délétion) afin de mettre au point des tests *in vitro* et *in vivo* qui permettent l'identification de composés actifs (peptides ou composés organiques) capables de reconstituer l'activité normale du couple htt-CA150. L'efficacité *in vivo* de tels composés pourra être directement testée dans les modèles animaux de HD qui permettent des études de pharmacologie en terme de toxicité, pharmacocinétique, doses efficaces (par exemple chez le primate, cf. Palfi et al., 1998).

CA150 est un facteur modulateur de la transcription nucléaire qui interagit avec la RNA polymérase de type II (Shune et al., 1997), et porte une zone répétée (riche en Alanine et en Glutamine) qui est présente dans plusieurs autres facteurs modulateurs de la transcription comme GAL11 ou SSN6 dans la levure, ou encore Zeste dans la drosophile. A l'aide d'amorces nucléotidiques aux bornes de la région nucléotidique correspondant au domaine (QA)60 et après analyse classique des produits PCR sur gel de polyacrylamide et autoradiographie, les inventeurs ont mis en évidence que le domaine (QA)60 de CA150 est polymorphique (4 allèles entre 57 et 62 QA, 30% d'hétérozygotie) dans la population normale après avoir testé 20 individus sains (10 couples père-mère ; familles de référence du CEPH

d'origine américaine numéro 102, 1332, 1331, 1340, 1347, 1362, 1413, 1416, 1423, 884). Du fait du polymorphisme et de la position du domaine polyQA (entre 2 domaines WW), ces données suggèrent que le polymorphisme des répétitions QA dans CA150 pourrait être impliqué dans l'apparition et la progression de HD chez les malades, et pourrait moduler l'activité physiologique de CA150, notamment sa liaison avec la htt, ce d'autant plus que les répétitions QA dans CA150 sont aussi impliqués dans des phénomènes d'agrégation de CA150 tel qu'observé par les Inventeurs. L'analyse des homologues de CA150 avec les EST humains disponibles dans Genbank et dans dbEST a permis d'établir que le gène de CA150 est exprimé dans plusieurs tissus humains dont le cerveau (utérus, amygdales, sein, muscle, rein, poumon, parathyroïde, testicule, cœur, embryon entier, colon, oreille, sang). 80 EST humains (représentant 71 clones d'ADNc) correspondent au gène de CA150 (localisation chromosomique : chromosome 5) d'après l'analyse Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Unigene>), dont 4 EST correspondant à 4 clones d'ADNc de cerveau (clone IMAGE 38349, et clones GEN-158H06, GEN-121H03, et HFBCA63). Quatre autres clones d'ADNc de cerveau humain correspondant à CA150 (numéros d'accèsion Genbank M78358, R87450, AI216964, et HUM121HO3A) ont pu être détectés par les inventeurs dans les banques de données.

Ces EST provenant de séquences obtenues dans plusieurs laboratoires différents, il est difficile de prédire avec précision le niveau d'expression du gène de CA150 dans chacun de ces tissus humains à partir du nombre d'EST. Cependant, le fait que les clones d'ADNc de cerveau humain représentent au total approximativement 11% (8/71 clones) des clones d'ADNc humain correspondant à CA150 suggère que CA150 n'est pas un facteur de transcription ubiquitaire exprimé à haut niveau dans tous les tissus (comme par exemple la TATA-binding protein), et suggère que CA150 pourrait présenter une activité préférentielle dans certaines sous-populations neuronales du cerveau. L'intérêt de CA150 est appuyé par le fait que d'autres PPH comme HYPM ou HYPE (Faber et al., 1998) ne

semblent pas exprimées dans le cerveau humain du fait de l'absence d'EST de cerveau humain correspondant à leurs gènes (base de données Unigène). L'intérêt de CA150 est aussi appuyé par le fait que la htt présente une forte proportion d'EST dans le cerveau, ce qui reflète une expression de la htt dans toutes les cellules du cerveau y compris celles qui ne sont atteintes dans HD, tandis que CA150 présente une faible proportion d'EST de cerveau qui est susceptible de refléter une expression sélective de CA150 dans certains neurones du cerveau, éventuellement ceux atteints dans HD.

Les Inventeurs se sont donc attachés à mettre en évidence des molécules susceptibles de mimer l'activité de la htt normale ou CA150 de façon à les utiliser ensuite en tant que palliatif de l'un ou l'autre de ces composés afin de restaurer la fonctionnalité du couple htt normale / CA150. Les molécules en question peuvent être tous types de composé (molécules naturelles, peptides synthétiques, composés organiques, produits combinatoires) susceptibles de mimer soit l'activité de la htt normale soit de tout fragment N-terminal de la htt normale présentant une activité similaire à celle de la htt normale non seulement dans son interaction avec CA150 mais également dans les conséquences de cette interaction, notamment en ce qui concerne les expressions ou répressions de gènes induites par le fonctionnement normal de ce couple. De préférence, le fragment N-terminal en question aura au plus 546 acides aminés.

En ce qui concerne les molécules susceptibles de mimer l'activité de CA150, dans le cadre de la présente invention, ces molécules comprennent également les molécules capables de mimer l'activité d'un fragment fonctionnel de CA150, c'est-à-dire d'un fragment susceptible de remplir une fonction similaire à celle de CA150 non seulement dans son interaction avec la htt normale mais également dans les conséquences de cette interaction, notamment en ce qui concerne les expressions ou répressions de gènes induites par le fonctionnement normal de ce couple.

En effet, la simple surexpression d'un fragment fonctionnel de CA150, par exemple un fragment dépourvu de la région (QA)38, est susceptible de permettre un rétablissement du fonctionnement normal de ce couple.

5        Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de criblage de molécules capables de modifier l'interaction htt normale / CA 150 comprenant :

- a) une pré-incubation de la htt normale ou d'un de ses fragments N-terminaux avec une molécule à tester,
- 10        b) l'élimination des molécules à tester restées libres dans le milieu de pré-incubation,
- c) l'ajout au milieu résultant de b) de la CA 150 ou d'un fragment fonctionnel de CA150,
- d) l'élimination de CA 150 ou fragment fonctionnel de CA 150
- 15        après incubation du milieu c),
- e) la mesure de la constante d'affinité du couple htt normale ou fragment N-terminal de celle-ci / CA 150 ou fragment fonctionnel de CA 150 issu de d),
- f) la comparaison de la constante d'affinité mesurée en e) avec une
- 20        constante d'affinité standard du couple htt normale / CA 150.

De façon à compléter ce procédé ou selon que la molécule à tester est soupçonnée de mimer la htt normale ou un fragment N-terminal de celle-ci ou bien CA150 ou un fragment fonctionnel de CA150, il peut être intéressant « d'inverser » les réactifs mis en œuvre dans ce procédé en

25        effectuant la préincubation en a) avec CA150 ou un fragment fonctionnel de CA150 et en ajoutant en c) la htt normale ou un fragment N-terminal de celle-ci. Bien évidemment, dans ce cas, c'est la htt normale ou le fragment N-terminal de celle-ci resté libre dans le milieu de c) qui sera ensuite éliminé au niveau de l'étape d).



Dans un mode de réalisation avantageux du procédé conforme à l'invention, le composé fixé à l'étape a) du susdit procédé est fixé sur phase solide qui peut être choisie parmi des billes, un tube, une plaque, etc.

En fait, le procédé conforme à l'invention tel que ci-dessus écrit  
5 permet de mettre en évidence une compétition intervenant entre la molécule à tester et htt normale ou un fragment N-terminal de htt normale ou bien CA150 ou un fragment de CA150, en fonction de l'ordre des réactifs utilisés. En effet, si la comparaison de la constante d'affinité mesurée en e) (du susdit procédé) avec une constante d'affinité standard du couple htt  
10 normale / CA150 révèle une interaction pour ledit couple plus faible que celle connue dans des conditions standard, alors il conviendra de s'intéresser à la molécule testée qui sera vraisemblablement à l'origine de cette « perte d'interaction » en tant que palliatif à l'un ou l'autre des éléments du couple en question.

15 Ainsi, afin d'approfondir une telle donnée, le procédé conforme à l'invention peut comprendre de plus une étape g) dans laquelle on mesure la constante d'affinité du couple molécule testée / htt normale ou fragment N-terminal de celle-ci, ou bien du couple molécule testée / CA 150 ou fragment fonctionnel de CA150, et facultativement une étape h) dans  
20 laquelle on compare la constante d'affinité obtenue en g) avec la constante d'affinité standard htt normale / CA 150. Une telle démarche permettra en effet de préciser la force de l'interaction de la molécule à tester avec htt ou CA150 (ou l'un de leur fragment).

Dans le cas où les deux susdites étapes confirmeraient la potentialité  
25 d'une molécule testée à interagir au niveau du couple htt normal / CA150, il convient d'ajouter au procédé conforme à l'invention une étape i) dans laquelle on identifie la molécule testée pour laquelle la constante d'affinité mesurée à l'étape g) est significative d'une interaction avec htt normale ou un fragment N-terminal de celle-ci ou bien avec CA150 ou un fragment  
30 fonctionnel de CA150. Cette molécule revêt en fait un intérêt particulier et la présente invention a également pour objet son utilisation pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington. En effet, cette molécule est susceptible de rétablir en tout ou partie une fonctionnalité normale du couple htt normale / CA150

et ainsi d'empêcher l'apoptose neuronale ou le dysfonctionnement neuronal induit par la htt mutée dans les cellules concernées. Il n'est pas exclu qu'une telle molécule présente avec htt normale ou un fragment N-terminal de celle-ci ou bien avec CA150 ou un fragment fonctionnel de CA150, une  
5 constante d'affinité supérieure à la constante d'affinité standard connue pour le couple htt normale / CA150. Dans ce cas, il conviendra d'utiliser à dessein ce type de molécule.

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification de cibles thérapeutiques pour la maladie de Huntington par  
10 l'analyse comparative des profils d'expression des ARNm issus de cellules saines avec des profils d'expression des ARNm issus de cellules dans lesquelles des pertes d'interactions htt normale / CA150 sont suspectées. Par ARNm on entend non seulement les ARNm totaux mais également certains  
15 ARNm (par Northern blot, par séquençage d'EST à partir de banques d'ADNc, par cDNA display, par hybridation soustractive d'ARNm ou d'ADNc, à l'aide de membranes ou de puces à ADN, ou toute combinaison de ces méthodes). Dans le cadre de la présente invention, ces ARNm peuvent être non seulement issus de cellules mais également de tissus ou  
20 d'organismes entiers (humains ou non humains). Lorsque ces cellules, tissus ou organismes sont dits « sains », il faut entendre : « à l'état normal », c'est-à-dire ne présentant pas d'expression de la htt mutée. Lorsqu'il est question de cellules, tissus ou organismes dans lesquels des pertes d'interaction htt normale / CA150 sont suspectées, il faut entendre qu'il s'agit là d'un état  
pathologique avec expression de la htt mutée.

25 Un tel procédé permet de mettre en évidence une sous-expression ou une sur-expression de gènes dans les cellules suspectées de présenter une perte d'interaction htt normale / CA150 par rapport à l'expression des mêmes gènes dans des cellules saines, et les séquences nucléotidiques correspondant à tout ou partie de ces gènes peuvent être utilisées dans le  
30 cadre de la présente invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington.

Par « séquence nucléotidique correspondant à une partie du gène », on entend toute séquence correspondant à un fragment fonctionnel du gène en question et dont l'expression est susceptible de donner lieu à un

polypeptide présentant une activité similaire à celle dudit gène au moins pour ce qui concerne son action sur la fonctionnalité du couple htt normale / CA150.

5 Par « sous- » ou « sur-expression », on entend toute expression de gène inférieure ou supérieure à la normale respectivement, détectable par les techniques courantes bien connues de l'homme du métier.

10 Dans le cas où le susdit procédé révèle qu'un gène est sous-exprimé dans les maladies suspectées de présenter des pertes d'interaction htt normale / CA150, la susdite utilisation consistera à introduire la séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie de ce gène dans les cellules concernées dans une construction contenant tous les éléments nécessaires à l'expression d'un gène, de façon à faire réexprimer ce gène *in situ* et ainsi restaurer la fonctionnalité du couple htt normale / CA150. Une telle démarche peut par exemple être réalisée par thérapie génique.

15 Dans le cas où le procédé ci-dessus décrit permet de mettre en évidence une sur-expression d'un gène dans des cellules suspectées de présenter des pertes d'interaction htt normale / CA150, la susdite utilisation consistera à bloquer *in situ* l'expression de ce gène par exemple au moyen d'une stratégie antisens.

20 La présente invention concerne également l'utilisation d'une séquence nucléotidique correspondant au gène de CA150 ou d'un fragment fonctionnel de CA150 afin de la sur-exprimer au moyen d'une construction comprenant tous les éléments nécessaires à cette sur-expression, au niveau de cellules suspectées de présenter des pertes d'interaction htt normale /  
25 CA150, ceci dans le cadre d'un traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington. En effet, dans le cas où CA150 normal serait déficient ou dans le cas où des cellules pathologiques contiendraient à la fois la htt mutée et la htt normale, une telle démarche consistant à sur-exprimer localement CA150 aurait pour effet de déplacer l'équilibre des interactions par  
30 saturation de la htt mutée et rendrait donc disponible le CA150 en surplus pour la htt normale présente dans lesdites cellules.

Ceci pourrait également être le cas avec des analogues hyperactifs de CA150 susceptibles de restaurer une fonctionnalité au moins équivalente à la fonctionnalité standard du couple htt normale / CA150.

La présente invention a également pour objet un anticorps anti-htt mutée susceptible de faire la discrimination entre htt normale et htt mutée. Elle concerne également l'utilisation d'un tel anticorps pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de  
5 Huntington. Une telle démarche de « neutralisation » de la huntingtine mutée pourrait d'ailleurs tout à fait s'accompagner d'une sur-expression locale de CA150 ou un fragment fonctionnel de CA150 et/ou de htt normale ou d'un fragment N-terminal de htt normale de façon à réintroduire les  
10 partenaires nécessaires au rétablissement de la fonctionnalité du couple htt normale / CA150. A titre d'exemple, ceci pourrait être réalisé par le biais de la thérapie génique.

La présente invention ne se limite pas à la susdite description. Elle sera mieux comprise à la lumière des expérimentations exposées ci-après.

## 15 PRESENTATION DES FIGURES

**Figure 1.** Test quantitatif (test ONPG en phase liquide) pour les interactions entre fragments N-terminaux de la htt et la protéine ZK1127.9\_187-758. Htt90 correspond au produit de l'exon 1 du gène de la htt. Htt 152 est un  
20 fragment qui est plus fortement susceptible de pénétrer dans le noyau des neurones que htt546. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes sur 45 mesures in vivo (9 cultures indépendantes ; 5 mesures/point/culture). Les intervalles représentent les bornes des valeurs obtenues.  $\Delta$  : pourcentage de différence de liaison entre allèle 15 Glns et allèle à 128 Glns. Les  
25 distributions des valeurs ONPG ont été comparées par analyse ANOVA à l'aide du logiciel Macintosh Statview.

**Figure 2.** Comparaison des protéines ZK.1127.9 et CA150. Les tailles anotées sont en nombre d'acides aminés. Carrés noirs : domaines WW. Zone  
30 hachurée : domaine (QA)60 polymorphe dans la population normale, 4 allèles, au minimum 15 % - 30 % d'hétérozygotie, en fonction de la population normale testée.

**Figure 3.** Interaction *in vitro* de la htt 152 normale (fixée sur billes de sépharose sous forme de protéine de fusion GST) et de ZK1127.09\_187-758: :HA. L'interaction est mise en évidence à l'aide d'un anticorps anti-HA. -htt152Q18 : pas de htt normale sur les billes de sépharose (contrôle négatif) ; +htt152Q18 : avec htt normale sur les billes de sépharose, dans ce cas la flèche indique la protéine ZK1127.9 éluée après rétention par la htt fixée sur les billes.

**Figure 4.** Interaction *in vitro* de la GST : :htt152 normale (fixée sur billes de sépharose sous forme de protéine de fusion GST) et de CA150 (fragment 133-910 aminoacides) : :HA. L'interaction est mise en évidence à l'aide d'un anticorps anti-HA.

**Figure 5.** Retard de migration sur gel de CA150 (fragment 133-910 aminoacides) après expression et purification dans *E. coli*. CA150 est détectée à l'aide d'un anticorps anti-HA ou d'un anticorps polyclonal anti-CA150. A : détection avec un anticorps anti-HA (origine commerciale). B : détection avec un anticorps polyclonal anti-CA150 (Sune et al., 1997). Ag : forme agrégée ; N.Ag : forme non agrégée.

**Figure 6.** Profil d'expression de la protéine CA150 sur coupes de cerveaux post-mortem d'individus normaux et de patients atteints de la maladie de Huntington. L'expression de CA150 a été testée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-CA150 (Sune et al., 1997). Les tests ont été réalisés dans le laboratoire de Robert Ferrante (Bedford VA medical Center, Bedford, USA). CA150 présente les profils d'expression suivants : A : Cortex humain, individu normal : expression diffuse, principalement nucléaire. B : Cortex humain, patient atteint de la maladie de Huntington : expression sous forme d'agrégats dans le noyau et dans le cytoplasme des neurones positifs. Ce profil d'expression est fortement similaire à celui observé avec un anticorps anti-huntingtine (tel que largement décrit dans la littérature), ce qui suggère que CA150 et huntingtine co-localisent dans les agrégats cellulaires chez les malades. C : striatum humain, individu normal : même observation que pour A. D : Striatum humain, patient atteint de la maladie de

Huntington : même observation que pour B. Lorsque l'anticorps polyclonal anti-CA150 est pré-incubé sur la nuit avec la protéine CA150 purifiée (test de préabsorption), aucun signal n'est visible, ce qui démontre la spécificité des marquages observés en A, B, C et D.

5

#### **METHODES ET DONNEES**

Les constructions destinées au criblage double-hybride et codant pour la htt ont été créées dans le vecteur pGBT9 (numéro d'accèsion  
10 Genbank UO7646, Clontech) sous forme de protéines de fusion avec le domaine de liaison de la protéine GAL4 (GAL4BD) pour les séquences d'ADN spécifiques qui ont été introduites dans le génome des levures hôtes. Les fragments d'ADNc codant pour la htt proviennent du laboratoire de Michael Hayden, University of British Columbia, Vancouver, Canada.  
15 Toutes les constructions ont été séquencées afin de vérifier la mise en phase de lecture des ADNc de la htt, le nombre de répétitions CAG, et l'absence de mutations ponctuelles ou de délétions. La banque d'ADNc de *C. elegans* (ADNc générés à l'aide d'une amorce oligo-dT) a été sous-clonée dans le vecteur pACT2 (numéro d'accèsion Genbank U29899, Clontech) sous  
20 forme de protéines de fusion avec le domaine d'activation de la transcription de GAL4 (GAL4AD). Cette banque d'ADNc est en accès libre et provient du laboratoire de R. Barstead (Oklahoma Medical Research Foundation, OK, USA). Le criblage en double-hybride a été effectué par utilisation d'un protocole basé sur la fusion de levures mat-a et mat-alpha (Bendixen et al.,  
25 1994), les levures mat-a (souche CG1945, Clontech) exprimant en l'occurrence les protéines de fusion [GAL4BD::htt], et les levures mat-alpha (souche Y187, Clontech) exprimant les fusions [fragments de protéines de *C. elegans*::GAL4AD].

30 La construction utilisée par les inventeurs pour le criblage (protéine de fusion avec GAL4BD) était htt546Q15 (Figure 1). Après criblage de  $3,8 \cdot 10^8$  clones (efficacité de fusion supérieure à 33%), 56 clones positifs ont été détectés. Après élimination des faux positifs (sur la base d'une interaction en double-hybride avec la protéine de fusion GAL4BD::lamine)

et vérification de la redondance des vrais positifs par analyse des profils de restriction (digestion enzymatique des ADNc sélectionnés à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et BamHI), les inventeurs ont séquencé les extrémités 5' et 3' des clones d'ADNc uniques résultants (soit 2 clones). La

5 recherche d'homologie de séquence entre les EST (Expressed Sequenced Tag) 3' et 5' obtenus pour ces clones et les protéines de *C. elegans* sur le serveur « BLAST *C. elegans* » au Sanger Centre, Cambridge, UK ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/blast\\_server.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/blast_server.shtml)) à l'aide des programmes BLAST (Altschul et al., 1997) a permis aux inventeurs

10 d'identifier la protéine ZK1127.9 comme partenaire de htt546Q15. Comme indiqué dans la banque publique de données Acedb, le gène de ZK1127.9 se trouve sur le chromosome II (cosmide ZK1127) de *C. elegans*. La séquence de la protéine ZK1127.9 a été prédite à partir de l'analyse de la séquence génomique de *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing consortium, 1998) et

15 contient 946 aminoacides. La comparaison des séquences d'extrémité 3' et 5' du clone d'ADNc correspondant à ZK1127.9 avec la banque *C. elegans* du Sanger Centre à l'aide des programmes BLASTN et BLASTX a permis d'établir que le clone d'ADNc correspondant au gène de la protéine ZK1127.9 code pour les aminoacides 187 à 758 de cette protéine. Les sites

20 de liaison de htt546Q15 sur ZK1127.9 sont donc localisés entre les aminoacides 187 à 758 de ZK1127.9 (ZK1127.9\_187-758). Le profil d'interaction de ZK1127.9\_187-758 avec différentes formes de la htt (htt546Q15, htt546Q128, htt152Q15, htt152Q128) a été analysé par les inventeurs à l'aide des tests en double-hybride (Bendixen et al., 1996),

25 initialement de façon qualitative après sélection des clones positifs sur gélose et transfert sur filtres de nylon, et ensuite de façon quantitative après sélection des clones positifs en phase liquide, extraction des protéines, et test ONPG en phase liquide (Kalchman et al., 1996). Les tests ONPG ont été effectués 45 fois, c'est à dire à partir de 9 cultures indépendantes de

30 levure, et de 5 mesures/cas/culture (Figure 1). L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel Statview (Macintosh) et de l'analyse des variances sur la distribution des valeurs obtenues pour chaque cas (Figure 1).

Des homologues de séquence de ZK1127.9 et de ZK1127.9\_187-758 avec d'autres gènes ont été recherchées par les inventeurs dans plusieurs banques de données publiques dont :

- Genbank au NIH, MD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- 5 - le serveur WWW « BLAST *C. elegans* » du Sanger Centre, Cambridge, UK ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/blast\\_server.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/blast_server.shtml))
- le serveur WWW de l'EBI, Cambridge, UK (<http://www2.ebi.ac.uk/service/blast>)

Ces recherches ont été effectuées à l'aide des programmes BLAST (Altschul et al., 1997) ou à l'aide de programmes basés sur l'algorithme de Smith et Waterman (Smith et Waterman, 1981) comme le programme bic2 (EBI). Par ailleurs, des domaines conservés ont été recherchés dans ZK1127.9, ZK1127.9\_187-758, et CA150 à l'aide du programme Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Softwares/Pfam/search.shtml>). Ces analyses ont

15 permis de mettre en évidence les faits suivants (Figure 2) :

- ZK1127.9\_187-758 contient 3 domaines WW (Pirozzi et al., 1997) aux positions 200-225, 262-292, et 378-407 amino-acides ( $0.00019 < \text{Evalue} < 0.011$ ). Les domaines WW sont des motifs de 35-40 amino-acides caractérisés par la présence de 4 résidus aromatiques
- 20 conservés dont deux sont des tryptophanes, sont des médiateurs des interactions protéine-protéine, et interagissent classiquement avec des domaines polyprolines (Pirozzi et al., 1997). Il est donc très probable que ZK1127.9\_187-758 interagit avec la région riche en prolines de la htt (htt : numéro d'accèsion Genbank L12392) qui est localisée immédiatement en
- 25 C-terminal du domaine polyQ (entre les amino-acides 40 et 100) et qui contient 2 polyprolines de 11 et 10 prolines consécutives. Il est aussi très probable que la liaison de la htt à CA150 implique les polyprolines et la région immédiatement C-terminale (sur au moins 30 aminoacides) aux domaines polyprolines dans la htt et les domaines WW aux positions 133-
- 30 162, 431-460 (correspondant au domaine WW 262-292 de ZK1127.9), et 532-559 aminocides ( $10^{-6} < \text{Evalue} < 0.0016$ ) de CA150. Le rôle médiateur de la région riche en polyprolines de la htt pour l'interaction avec des protéines à domaine WW a été illustrée par ailleurs (Faber et al., 1998).



- 5 - la région de ZK1127.9 allant des aminoacides 267 à 944 présente une homologie importante (amino-acides identiques : environ 38% ; amino-acides similaires : environ 69% ;  $p=1213$  en analyse Smith et Waterman, et  $p(N)=10^{-137}$  en analyse BLAST) avec la région 435 à 1095 aminoacides de la protéine humaine CA150 (numéro d'accèsion Genbank AF017789). Il existe aussi d'autres homologies plus faibles et non significatives pour des segments courts de ZK1127.9, comme par exemple des homologies avec des domaines WW présents dans d'autres protéines comme HYPA ou HYPB (Faber et al., 1998).

## REFERENCES

- Altschul SF, Thomas LM, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389-3402, 1997.
- 5     Bates GP, Mangiarini L, Davies SW. Transgenic mice in the study of polyglutamine repeat expansion diseases. Brain Pathol 8, 699-714, 1998.
- 10    Bargman CI. Neurobiology of the *C. elegans* genome. Science 282, 2028-2033, 1998.
- Bendixen C, Gangloff S, and Rothstein R. A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. Nucleic Acids Res 22, 1778-1779, 1994.
- 15     Bertaux F, Sharp AH, Ross CA, Lehrach H, Bates GP, and Wanker E. HAP1-huntingtin interactions do not contribute to the molecular pathology in the Huntington's disease transgenic mice. FEBS letter 17, 229-232, 1998.
- 20     Boutell JM, Wood J, Harper PS, and Jones L. Huntingtin interacts with cystathionine  $\beta$ -synthase. Hum Mol Genet 7, 371-378, 1998.
- Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, Vance JM, and Strittmater WJ. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. Nature Medicine 2, 347-350, 1996.
- 25     Davies SW, Turmaine M, Cozens B, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CR, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, and Bates G. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. Cell 90, 537-548, 1997.
- 30     De Rooij KE, Dorsman JC, Smoor MA, Den Dunnen JT, and Van Ommen GJB. Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in

cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. Human Molecular Genet 5, 1093-1099, 1996.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, &  
5 Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 277, 1990-1993, 1997.

Engelender et al. 1997

10 Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF, and MacDonald ME. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. Hum Mol Genet 7, 1463-1474, 1998.

Faber PW, Alter JR, MacDonald ME, and Hart A. Polyglutamine-mediated  
15 dysfunction and apoptotic death of a *C. elegans* sensory neuron. Proc Natl Acad Sci USA 96, 170-184, 1999.

Fields S and Song OK. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340, 245-246, 1989.

20 Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, and Hayden MR. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. Nature Genet 13,  
25 442-449, 1996.

Hackam AS, Singaraja R, Zhang T, Gan L, and Hayden MR. In vitro evidence for both the nucleus and cytoplasmic subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease. Hum Mol Genet 8, 25-33, 1999.

30 Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, De Rooij KE, Roos RAC, and Van Ommen GJB, and Galjaard H. Characterization and localization of the Huntington disease gene product. Hum Mol Genet 2, 2069-2073, 1993.

Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arhheim N, Faber PW, MacDonald ME, and Zipursky SL. Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptors neurons. *Neuron* 21, 633-642, 1998.

5

Kalchman MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham KC, Goldberg YP, Gietz RD, Pickart CM, and Hayden MR. Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* 271, 19385-19394, 1996.

10

Kalchman MA, Koide HB, McCutcheon K, Graham RK, Nichol K, Nishiyama K, Kazemi-Esfarjani P, Lynn FC, Wellington C, Metzler M, Goldberg YP, Kanazawa I, Gietz RD, and Hayden MR. HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* 16, 44-52, 1997.

15

Koshy BT and Zoghbi HY. The CAG/polyglutamine tract diseases: gene products and molecular pathogenesis. *Brain Pathol* 7, 927-942, 1997.

20 Li X-J, Li S-H, Sharp AH, Nucifora Jr FC, Schilling G, Lanahan A, Worley P, Snyder SH, Ross CA. A Huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402, 1995.

Lunkes A and Mandel JL. A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 7, 1355-1361, 1998.

25

Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, and Bates G. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506, 1996.

30

- 5 Martindale D, Hackam A, Wieczoreck A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F, and Hayden MR. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nature Genet* 18, 150-154, 1998.
- 10 Néri C, Du Hongping, Morinière S, and Chalfie C. A *C. elegans* model of neuron dysfunction in polyglutamine expansion diseases: Suggestive evidence for polyglutamine-dependent intracellular aggregation and touch receptor neuron dysfunction. European Worm Meeting, August 1998, Hinxton, UK, p. 43.
- 15 Palfi S, Conde F, Riche D, Brouillet E, Dautry C, Mittoux V, Chibois A, Peschanski M, and Hantraye P. Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* 4, 963-966, 1998.
- 20 Pirozzi G, McConnell SJ, Uveges AJ, Carter JM, Sparks AB, Kay BK, Fowlkes DM. Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets. *J Biol Chem* 272, 14611-14616, 1997.
- 25 Ross CA. Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 19, 1147-1150, 1997.
- Ruvkun G and Hobert O. The taxonomy of developmental control in *C. elegans*. *Science* 282, 2033-2041, 1998.
- 30 Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, and Greenberg M. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66, 1998.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuc JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross

CA, and Borchelt DR. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. Hum Mol Genet 8, 397-407, 1999.

- 5 Sisodia SS. Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? Cell 95, 1-4, 1998.

Sittler A, Walter S, Wedemeyer N, Hasenbank R, Scherzinger E, Eickhoff H, Bates GP, Lehrach H, and Wanker E. SH3GL3 associates with the  
10 huntingtin Exon 1 protein and promotes the formation of polyglutamine-containing aggregates. Molecular Cell 2, 427-436, 1998.

Sharp AH, Zhang C, Cannon M, Becher MW, Cooper JK, Schilling G, Borchelt DR, Ross CR. Possible cleavage products of huntingtin in HD  
15 nuclear inclusions and huntingtin transgenic mice. Abstract in: Huntington's Disease: new progress. Proceedings of the Hereditary Disease Foundation meeting, New Seabury, MA; August 9-10, 1998.

Sune C, Hayashi T, Liu Y, Lane WS, Young RA, Garcia-Blanco MA.  
20 CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated immunodeficiency virus type 1 transcription. Mol Cell Biol 17, 6029-6039, 1997.

Smith and Waterman. Identification of common molecular subsequences. J  
25 Mol Biol 147, 195-197, 1981.

The *C. elegans* sequencing consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. Science 282, 2012-2018,  
1998.

30

Wanker EE, Rovira C, Scherzinger E, Hasenbank R, Walter S, Trait D, Colicelli J, and Lehrach H. HIP-1: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. Hum Mol Genet 6, 487-495, 1997.

White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, and MacDonald M. Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature Genet* 17, 404-410, 1997.

5

Zeitlin S, Liu J-P, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genet* 11, 155-163, 1995.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de criblage de molécules capables de modifier  
5 l'interaction htt normale / CA150 comprenant :
  - a) une pré-incubation de la htt normale ou d'un de ses fragments N-terminaux avec une molécule à tester,
  - b) l'élimination des molécules à tester restées libres dans le milieu de pré-incubation,
  - 10 c) l'ajout au milieu résultant de b) de CA150 ou d'un fragment fonctionnel de CA150,
  - d) l'élimination de CA150 ou fragment fonctionnel de CA150 après incubation du milieu c),
  - e) la mesure de la constante d'affinité du couple htt normale ou  
15 fragment N-terminal de celle-ci / CA150 ou fragment fonctionnel de CA150 issu de d),
  - f) la comparaison de la constante d'affinité mesurée en e) avec une constante d'affinité standard du couple htt normale / CA150.
2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel :
  - 20 - la pré-incubation en a) est effectuée avec CA150 ou un fragment fonctionnel de CA150,
  - en c) la htt normale ou fragment N-terminal de celle-ci est ajouté, et
  - en d) la htt normale ou fragment N-terminal de celle-ci resté libre  
25 dans le milieu de c) est éliminé.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel l'étape a) est réalisée par une fixation de la htt normale, d'un fragment N-terminal de celle-ci, de la CA150 ou d'un fragment fonctionnel de CA150, sur phase solide.



4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant de plus une étape g) dans laquelle on mesure la constante d'affinité du couple molécule testée / htt normale ou fragment N-terminal de celle-ci ou CA150 ou fragment fonctionnel de CA150, et facultativement une étape h) dans laquelle on compare la constante d'affinité obtenue en g) avec la constante d'affinité standard htt normale / CA150.

5. Procédé selon la revendication 4 comprenant de plus une étape i) dans laquelle on identifie la molécule testée pour laquelle la constante d'affinité mesurée à l'étape g) est significative d'une interaction avec htt normale ou fragment N-terminal de celle-ci ou CA150 ou fragment fonctionnel de CA150.

6. Utilisation de la molécule identifiée selon la revendication 5 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington.

7. Procédé d'identification de cibles thérapeutiques pour la maladie de Huntington par l'analyse comparative des profils d'expression des ARNm issus de cellules saines avec des profils d'expression des ARNm issus de cellules dans lesquelles des pertes d'interaction htt normale / CA150 sont suspectées.

8. Utilisation d'une séquence nucléotidique correspondant en tout ou partie à un gène sous-exprimé dans des cellules suspectées de présenter des pertes d'interaction htt normale / CA150 par rapport à des cellules saines conformément au procédé selon la revendication 7, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington.

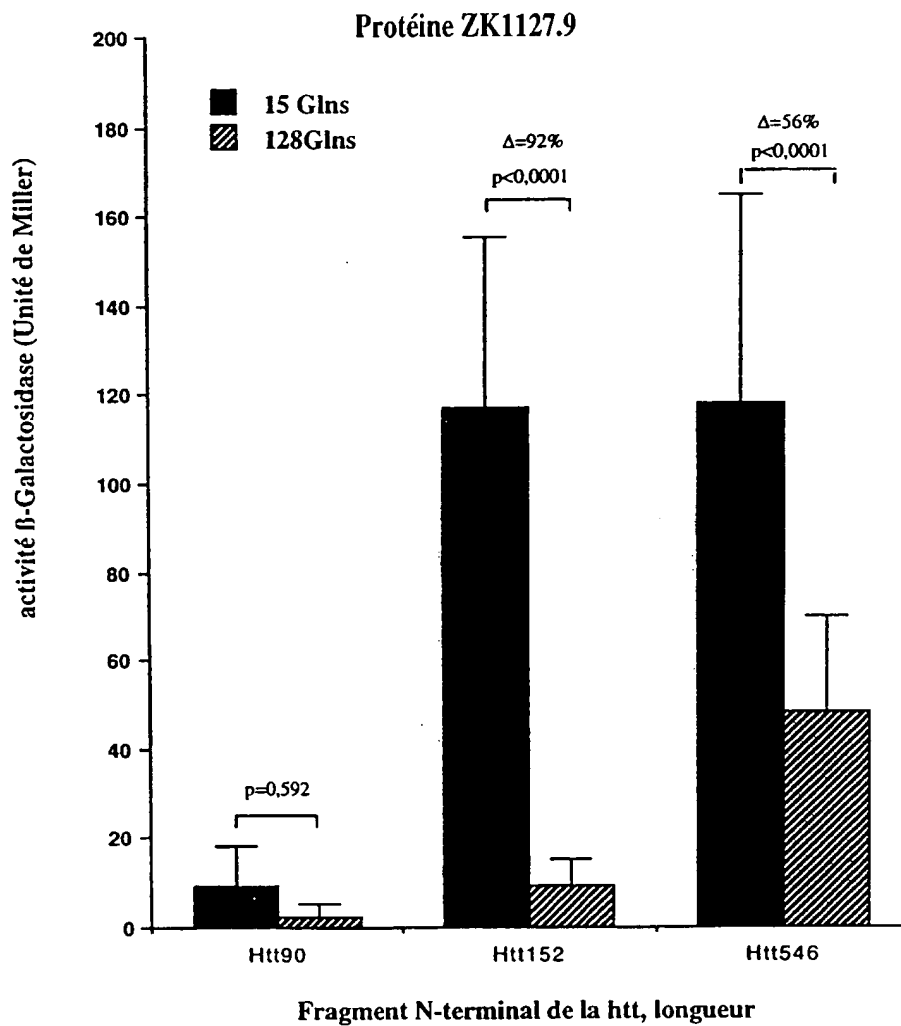
9. Utilisation d'une séquence nucléotidique correspondant en tout ou partie à un gène sur-exprimé dans des cellules suspectées de présenter des pertes d'interaction htt normale / CA150 par rapport à des cellules saines conformément au procédé selon la revendication 7, pour la préparation d'un

médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington.

10. Utilisation d'une séquence nucléotidique correspondant au gène de CA150 ou d'un fragment fonctionnel de CA150 pour la préparation d'un
- 5 médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington par sur-expression de ladite séquence dans des cellules suspectées de présenter des pertes d'interaction htt normale / CA 150.

11. Anticorps anti-htt mutée.

12. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 11 pour la
- 10 préparation d'un médicament destiné au traitement curatif ou préventif de la maladie de Huntington.

**FIGURE 1**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No

PCT/FR 00/02036

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	HEISER VOLKER ET AL: "Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: Implications for Huntington's disease therapy." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 12, 6 juin 2000 (2000-06-06), pages 6739-6744, XP002155981 June 6, 2000 ISSN: 0027-8424 le document en entier ---	11,12
A	WO 97 17443 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 15 mai 1997 (1997-05-15) cité dans la demande abrégé revendications 29,32 ---	1-5,7-12
A	FABER PETER W ET AL: "Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins." HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 7, no. 9, 1998, pages 1463-1474, XP000971475 ISSN: 0964-6906 cité dans la demande le document en entier ---	1-5,7-12
A	WO 97 18825 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ; HAYDEN MICHAEL R (CA); KALCHMAN MICHAEL (CA) 29 mai 1997 (1997-05-29) cité dans la demande le document en entier ---	1-5,7-12
A	SUNE CARLOS ET AL: "CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 17, no. 10, 1997, pages 6029-6039, XP000971477 ISSN: 0270-7306 cité dans la demande le document en entier -----	1-5,7-10

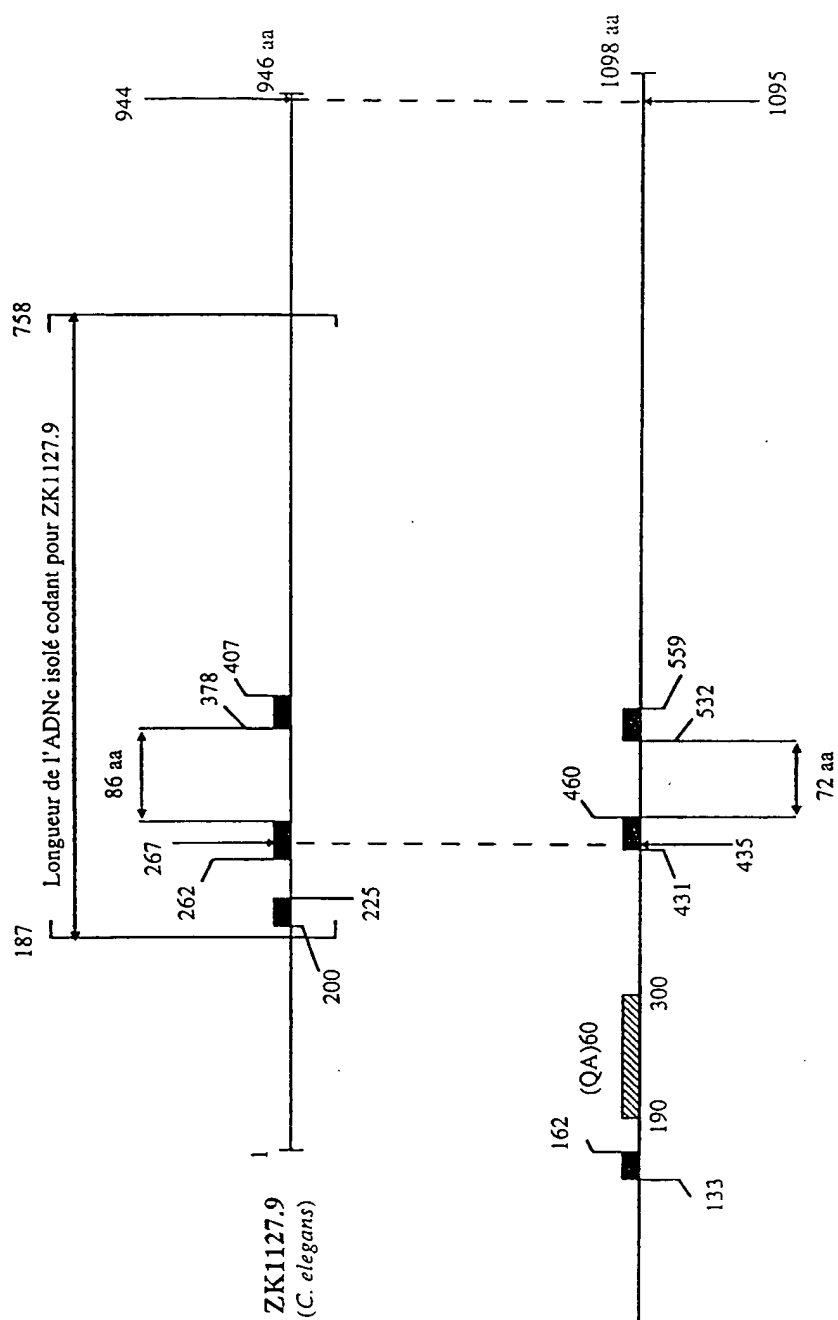


FIGURE 2

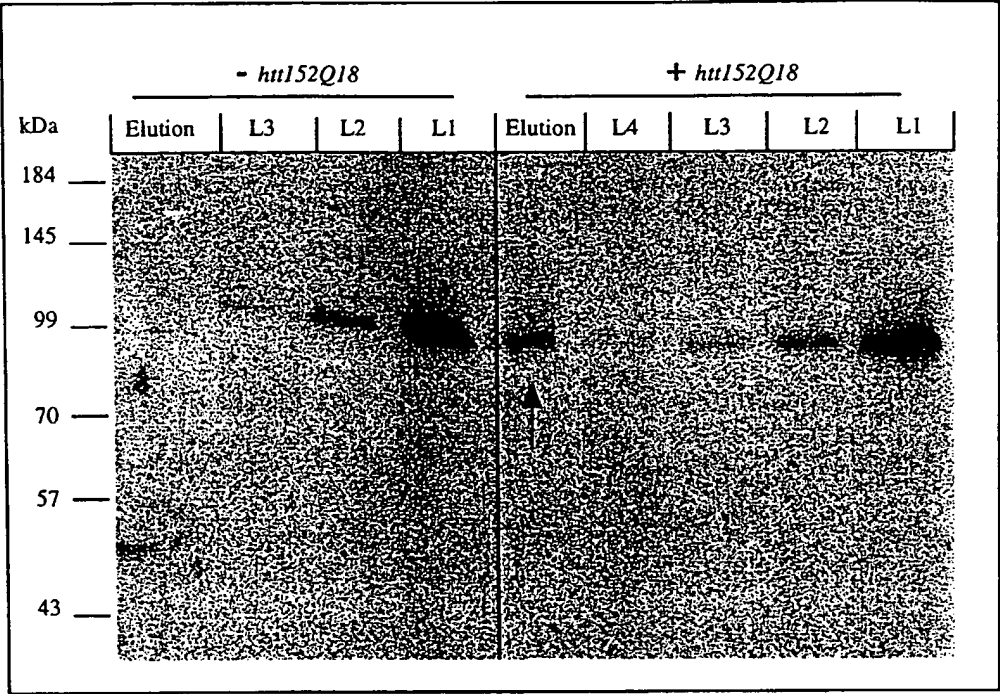


Figure 3

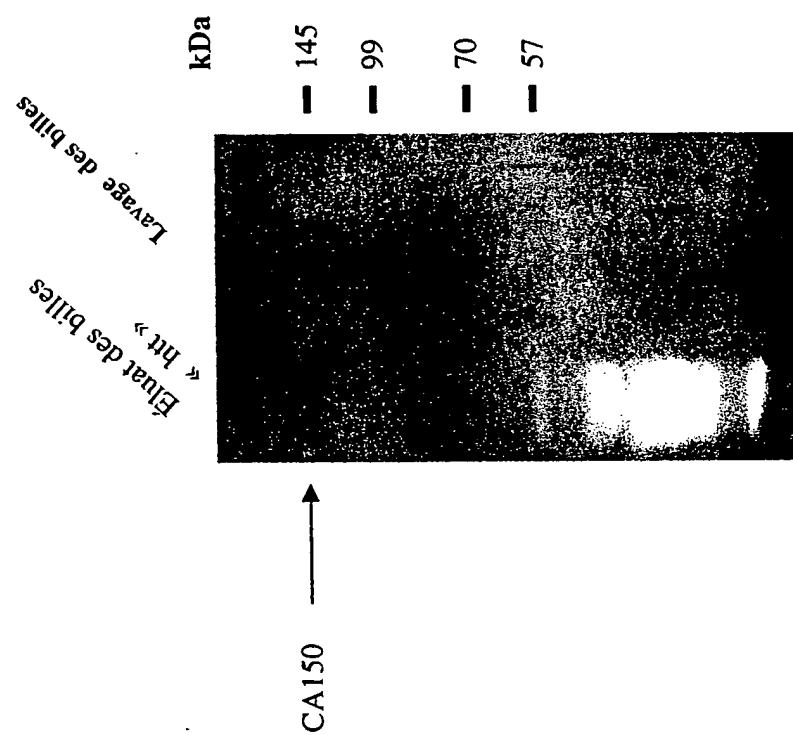
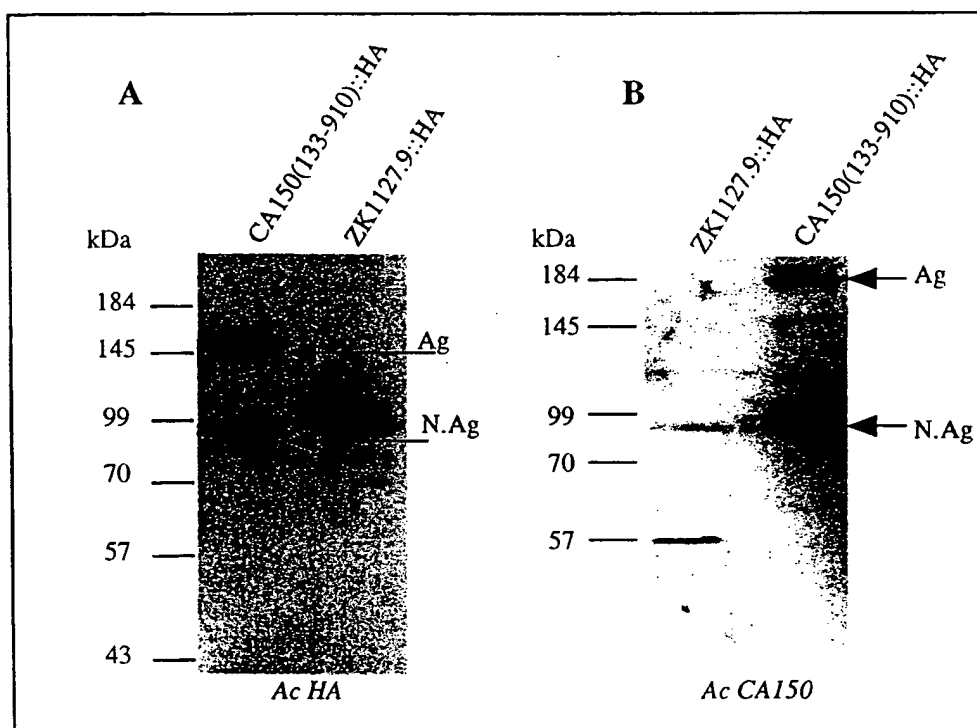
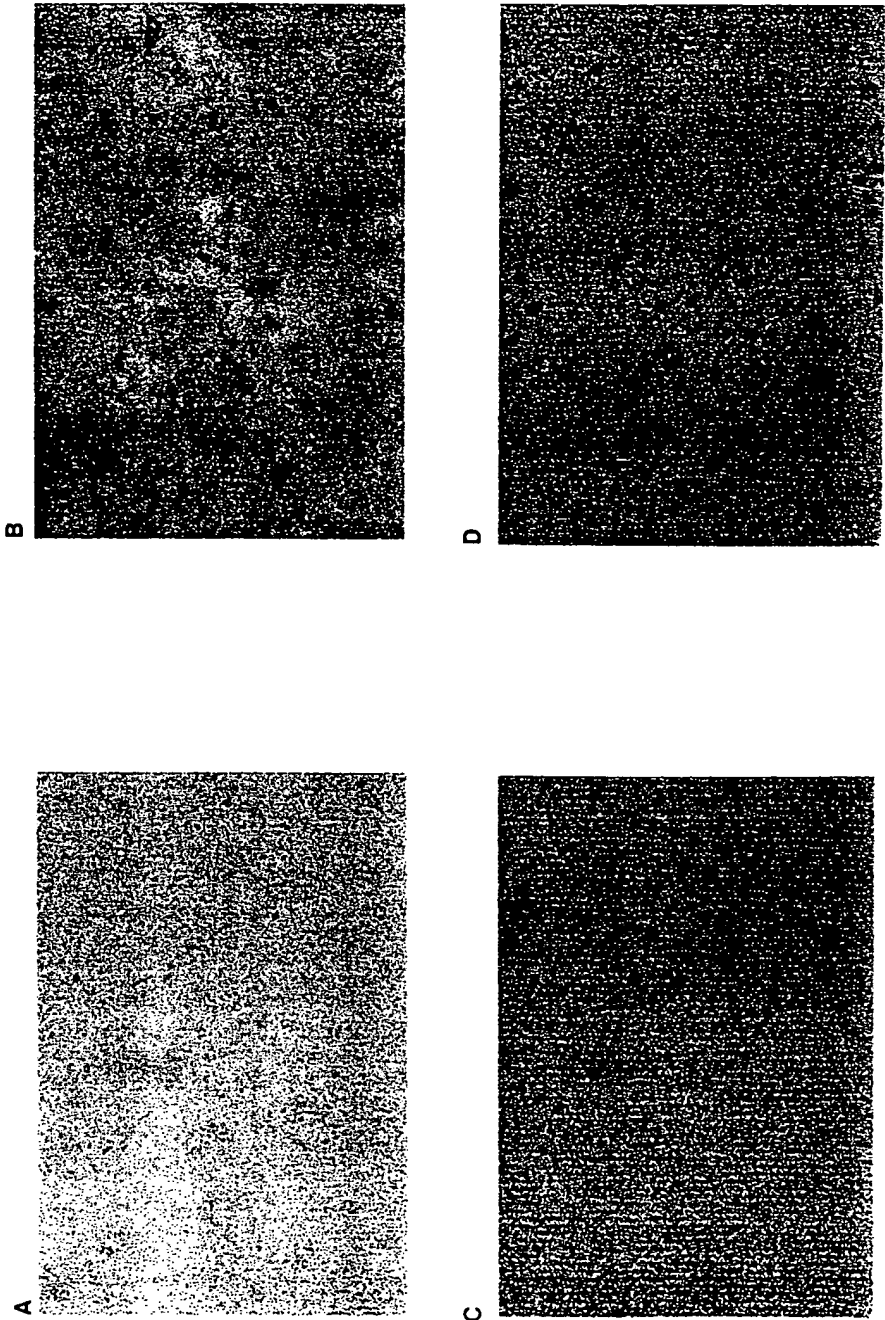


Figure 4

**Figure 5**





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02036

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 C12Q1/68 C07K16/18 A61K48/00 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 614 977 A (GEN HOSPITAL CORP) 14 September 1994 (1994-09-14) claim 11	11,12
X	--- TROTIER YVON ET AL: "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias." NATURE (LONDON), vol. 378, no. 6555, 1995, pages 403-406, XP002155980 ISSN: 0028-0836 the whole document --- -/--	11,12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2000

Date of mailing of the international search report

11/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02036

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	HEISER VOLKER ET AL: "Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: Implications for Huntington's disease therapy." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 12, 6 June 2000 (2000-06-06), pages 6739-6744, XP002155981 June 6, 2000 ISSN: 0027-8424 the whole document	11,12
A	WO 97 17443 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 15 May 1997 (1997-05-15) cited in the application abstract claims 29,32	1-5,7-12
A	FABER PETER W ET AL: "Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins." HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 7, no. 9, 1998, pages 1463-1474, XP000971475 ISSN: 0964-6906 cited in the application the whole document	1-5,7-12
A	WO 97 18825 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;HAYDEN MICHAEL R (CA); KALCHMAN MICHAEL (CA) 29 May 1997 (1997-05-29) cited in the application the whole document	1-5,7-12
A	SUNE CARLOS ET AL: "CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 17, no. 10, 1997, pages 6029-6039, XP000971477 ISSN: 0270-7306 cited in the application the whole document	1-5,7-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR/00/02036

Continued from field I.2

Claim nos.: 6

Claim no. 6 relates to the use of a molecule which is defined in terms of a desirable characteristic, in particular, its ability to be identified in accordance with claim no. 5. The claim covers the use of all molecules having this characteristic although the patent application does not support and/or does not disclose any specific molecule that is defined in terms of its chemical structure, within the meaning of PCT Art. 6 and/or PCT Art. 5 respectively.

Notwithstanding the reasons given above, claim no.6 does not provide any way of distinguishing the novel molecules from the molecules found in the prior art that can be identified using the method in claim no.5. It is therefore impossible to deduce any definition of the subject matter for which protection could legitimately be sought from claim no.6 (PCT Art. 6).

This lack of clarity, support and disclosure is such that a meaningful search of the subject matter covered by claim no.6 is impossible.

The applicant is advised that patent claims relating to inventions for which no international search has been produced cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or to cases where the applicant presents new patent claims in the course of the PCT Chapter II procedure.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern 1st Application No

PCT/FR 00/02036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0614977 A	14-09-1994	AU 676001 B	27-02-1997
		AU 5642994 A	08-09-1994
		CA 2116280 A	06-09-1994
		JP 7067661 A	14-03-1995
		US 5686288 A	11-11-1997
		US 5693757 A	02-12-1997
WO 9717443 A	15-05-1997	US 6093549 A	25-07-2000
		AU 1117597 A	29-05-1997
		EP 0866858 A	30-09-1998
WO 9718825 A	29-05-1997	CA 2238075 A	29-05-1997
		EP 0873132 A	28-10-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No  
PCT/FR 00/02036

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/68 C12Q1/68 C07K16/18 A61K48/00 A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N C07K C12Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 614 977 A (GEN HOSPITAL CORP) 14 septembre 1994 (1994-09-14) revendication 11	11,12
X	--- TROTIER YVON ET AL: "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias." NATURE (LONDON), vol. 378, no. 6555, 1995, pages 403-406, XP002155980 ISSN: 0028-0836 le document en entier --- -/--	11,12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/01/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Pellegrini, P

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 6

La revendication 6 se réfère à l'utilisation d'une molécule définie en faisant référence à une propriété souhaitable, en particulier à sa capacité d'être identifiée selon la revendication 5. La revendication comprend l'utilisation de toutes les molécules ayant cette propriété, tandis que la demande de brevet ne donne un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'article 5 PCT pour aucune molécule précise définie en termes de sa structure chimique.

Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, la revendication 6 ne fournit aucun moyen de distinguer les molécules nouvelles des molécules faisant partie de l'état de la technique mais pouvant être identifiées par la méthode de la revendication 5. Aucune définition de la matière pour laquelle une protection pourrait être légitimement revendiquée ne peut donc être déduite de la revendication 6 (Article 6 PCT).

Ce manque de clarté, fondement et exposé est tel qu'une recherche significative sur la matière couverte par la revendication 6 est impossible.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demr internationale No  
PCT/FR 00/02036

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0614977 A	14-09-1994	AU 676001 B	27-02-1997
		AU 5642994 A	08-09-1994
		CA 2116280 A	06-09-1994
		JP 7067661 A	14-03-1995
		US 5686288 A	11-11-1997
		US 5693757 A	02-12-1997
WO 9717443 A	15-05-1997	US 6093549 A	25-07-2000
		AU 1117597 A	29-05-1997
		EP 0866858 A	30-09-1998
WO 9718825 A	29-05-1997	CA 2238075 A	29-05-1997
		EP 0873132 A	28-10-1998



outil d'étude puissant pour l'identification et la validation (au niveau cellulaire, et avant étude pharmacologique anatomo-fonctionnelle dans des modèles plus complexes comme la souris ou le primate) de cibles thérapeutiques. Plus particulièrement, les inventeurs se sont attachés à  
5 étudier les interactions entre une protéine de maladie humaine, la htt, et l'ensemble des protéines répertoriées chez *C. elegans*, ce à l'aide de la technique du criblage en double-hybride (Fields and Song, 1987) de façon à reconstruire, en partie au moins, le schéma des voies de signalisation qui sont impliquées dans le fonctionnement normal de la htt avant expansion de  
10 polyQ, et dans le fonctionnement pathologique de la htt après expansion de polyQ. Suite au criblage double-hybride, l'analyse des homologues entre le gène d'intérêt identifié dans *C. elegans* et ses homologues chez l'homme permet de prédire efficacement la nature des mécanismes pathologiques en jeu dans HD et de définir les premières bases d'une intervention  
15 thérapeutique, ce à quoi se sont aussi attachés les inventeurs.

Les données obtenues par les inventeurs concernent donc l'identification de phénomènes de variation d'interaction entre une protéine de *C. elegans* qui s'avère être une protéine à domaine WW de 946 aminoacides et certains fragments de la htt normale ou mutée (perte  
20 d'interaction). Bien que la fonction de ZK1127.9 soit inconnue dans le nématode, cette protéine présente des caractéristiques qui suggèrent fortement que l'activité de régulation de la transcription des gènes de l'homologue humain de ZK1127.9 (CA150) est modulée par des fragments N-terminaux de la htt dont le poids moléculaire est compatible avec un  
25 passage dans le noyau des cellules neuronales au travers des pores nucléaires.

En effet, les fragments N-terminaux de la htt utilisés par les inventeurs, notamment htt152, ont la capacité, de part leurs poids moléculaires (environ 10-70 kDa), de pénétrer dans le noyau des neurones  
30 par les pores nucléaires, sans doute de façon passive (Hackam et al., 1998).

De plus, ZK1127.9\_187-758 présente une perte d'interaction de 92 % avec la forme mutée htt152Q128 en comparaison de htt152Q15. Lorsque la taille de la htt est de 546 amino-acides, la perte d'interaction moyenne de ZK1127.9\_187-758 pour htt546Q128 en comparaison de htt546Q15 est de